

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.03.09

# 长效土霉素注射液的急性毒性及肌肉刺激性研究

任含柳, 路美玉, 段鹏, 黄月辉

(华北制药集团动物保健品有限责任公司, 石家庄 050000)

[收稿日期] 2019-10-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 02-0049-04 [中图分类号] S859.796

**[摘要]** 为考察新型长效土霉素注射液的安全性, 分别对小白鼠和家兔进行急性毒性和局部刺激性试验。随机将 60 只小白鼠分为 6 组, 每组 10 只, 其中雌雄各半, 进行急性毒性试验考察; 随机将 9 只家兔分为 3 组, 每组 3 只, 进行局部刺激性试验。结果表明, 该新型长效土霉素注射液小鼠肌肉注射  $LD_{50}$  为 600.32 mg/kg,  $LD_{50}$  的 95% 的可信区间为  $(600.32 \pm 2.44)$  mg/kg; 随着时间延长和给药剂量增加, 刺激性增强, 注射长效土霉素 7 d 后, 家兔股四头肌出现红肿、发紫、坏死、光泽消失现象, 15 d 后肌肉组织的坏死范围扩大。该产品对小白鼠表现为低毒, 对家兔的股四头肌有局部刺激性。

**[关键词]** 长效土霉素注射液; 急性毒性; 局部刺激性

## Acute Toxicity and Muscle Irritation of Long Acting Oxytetracycline Injection

REN Han-liu, LU Mei-yu, DUAN Peng, HUANG Yue-hui

(North China Pharmaceutical Corporation Group Veterinary Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract:** In order to investigate the safety of the new long-acting oxytetracycline injection, acute toxicity test and local irritation test were carried out on mice and rabbits respectively. Sixty mice were randomly divided into six groups, 10 mice in each group, half male and half female, and acute toxicity test was carried out. Nine rabbits were randomly divided into three groups with 3 rabbits in each group for local stimulation test. The results showed that the  $LD_{50}$  of the new long-acting oxytetracycline injection was 600.32 mg/kg, and the 95% confidence interval of  $LD_{50}$  was  $(600.32 \pm 2.44)$  mg/kg. With the prolongation of time and the increase of dosage, the irritation increased. The swelling, purple, necrosis and gloss disappeared in quadriceps femoris muscle of rabbits 7 d after injection of long-acting oxytetracycline, and the necrosis area of muscle tissue expanded 15 d later. The results showed that the product had low toxicity to mice and local irritation to rabbit quadriceps femoris.

**Key words:** long-acting oxytetracycline injection; acute toxicity; local irritation

长效土霉素注射液属四环素类抗生素,具有广谱抗菌作用,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、衣原体、支原体及立克次体均有效,临床也常用于治疗附红细胞体等病,并且能够维持较长有效血药浓度时间。其作用机制主要在于药物可以特异性地与核糖体 30S 亚基的 a 位置结合,从而阻止氨基酰-tRNA 在该位置上的联结,进而抑制肽链的增长和影响细菌或其他病原微生物的蛋白质合成。20 世纪美国辉瑞制药公司率先开发成功长效土霉素注射液,其商品名为“得米先”,上市后迅速得到普及。近些年来,我国也成功研制出了长效土霉素注射液,但同国外产品相比仍有较大的差距,主要表现在稳定性差、工艺控制难等问题<sup>[1]</sup>,这就大大降低了国内相关产品的市场竞争力<sup>[2]</sup>。为提高长效土霉素注射液的缓释作用,同时克服长效土霉素注射液的稳定性缺陷,本文通过预试验筛选有机复合溶剂、缓释剂、抗氧化剂、稳定剂及 pH 调节剂,确定采用  $\alpha$ -吡咯烷酮、二甲基乙酰胺、聚乙烯吡咯烷酮 K30 等有机溶媒,经过特殊工艺制备,得到一种新型的长效土霉素注射液。前期试验表明,该长效土霉素注射液成本低、稳定性好<sup>[3]</sup>。为探讨该长效土霉素注射液的急性毒性及刺激性,本研究分别进行了小鼠急性毒性和家兔局部刺激性试验,以期为临床应用提供试验依据。

## 1 材料与方法

1.1 试验药品 长效土霉素注射液,由华北制药集团动物保健品有限责任公司研发部实验室制备。均用灭菌生理盐水稀释至适宜倍数后使用。

1.2 试验动物及管理 选取 60 只健康昆明种小白鼠(雌雄各半),体重为  $19 \pm 2$  g,试验动物及饲料均购自沈阳市双义试验动物研究所。选取 27 只健康成年家兔(雌雄各半),体重为 2.0~2.5 kg,试验动物及饲料均购自新疆医药大学实验动物中心。

### 1.3 方法

1.3.1 小鼠急性毒性试验 试验实施时间为 2018 年 9 月 10 日至 2018 年 9 月 17 日,试验场地为石家庄市某大学实验室。随机将 60 只小白鼠分为 6 组,每组 10 只,其中雌雄各半。根据预试验初步确

定出  $LD_0$  和  $LD_{100}$  分别为 408.7、759.7 mg/kg,确定正式试验分别以 408.7、462.6、523.7、592.9、671.1、759.7 mg/kg 的剂量,给小白鼠按照 0.1 mL/10 g 进行颈部肌肉注射。试验期为 7 d,各组以相同日粮及饮水常规饲养。

1.3.2 家兔局部刺激性试验 试验实施时间为 2018 年 9 月 15 日至 2018 年 9 月 29 日,试验场地为石家庄市某大学实验室。随机将 27 只家兔分为 3 组,每组 9 只。左侧股四头肌部位剪去兔毛,用 75% 乙醇和 2% 碘酊消毒后,分别在第一组成年家兔的左侧后股四头肌处注射灭菌生理盐水 1.00 mL 作对照,在第二组成年家兔的左侧后股四头肌处注射长效土霉素注射液 0.5 mL,在第三组成年家兔的左侧后股四头肌处注射长效土霉素注射液 1.00 mL。试验期为 15 d,各组以相同日粮及饮水常规饲养。

### 1.4 样品采集及处理

1.4.1 急性毒性试验 小白鼠颈部肌肉注射长效土霉素注射液后,观察 7 d 并记录每组临床症状和死亡情况,随机解剖 5 只小白鼠进行取样,观察肝脏、肾脏、心脏等内脏器官的变化情况。本试验采用改良寇氏法<sup>[4]</sup>。按照毒理学分级标准进行评定。

1.4.2 刺激性试验 成熟家兔注射后,每组分别于给药后 2、7、15 d 各处死 3 只,解剖后取股四头肌,纵向切开。观察注射部位肌肉组织的变化。

本试验采用成年家兔股四头肌法。按照肌肉组织刺激反应的评定标准<sup>[5]</sup>进行评定,0 级刺激反应,给药部位无明显反应;1 级刺激反应,给药部位轻度充血,直径 0.5 cm 以下;2 级刺激反应,给药部位中度充血,直径 1.0 cm 以下;3 级刺激反应,给药部位中度充血,红肿,肌肉有变性;4 级刺激反应,出现肌肉褐色变性,坏死 0.5 cm 以下;5 级刺激反应,肌肉严重变性,出现大片坏死。

1.5 数据分析 数据处理采用 SPSS 17 软件进行 One - Way ANOVA 方差分析,并用 Duncan 法进行多重比较,以  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

2.1 急性毒性试验 结果如表 1 所示。

表 1 长效土霉素注射液急性毒性试验

小白鼠死亡数 (n = 10)

Table 1 Mortality of mice in acute toxicity test of long-acting oxytetracycline injection (n = 10)

组别	动物数/只	剂量/(mg · kg <sup>-1</sup> )	死亡数/只	死亡率/%
1	10	408.7	0	0
2	10	462.6	2	20
3	10	523.7	3	30
4	10	592.9	4	40
5	10	671.1	6	60
6	10	759.7	9	90

由表 1 可知, 试验小白鼠共 6 组, 每组 10 只。6 组小白鼠给药剂量分别为 408.7、462.6、523.7、592.9、671.1、759.7 mg/kg, 观察 7 d 后, 各组死亡数(死亡率)分别为 0 只(0%)、2 只(20%)、3 只(30%)、4 只(40%)、6 只(60%)、9 只(90%)。随着给药剂量的增大, 小白鼠死亡数量逐渐增多。

表 2 长效土霉素注射液急性毒性试验

Tab 2 Acute toxicity test of long-acting oxytetracycline injection

序号	LD <sub>50</sub> /(mg · kg <sup>-1</sup> )	LD <sub>50</sub> 时 95% 的可信限/(mg · kg <sup>-1</sup> )
1	600.32	600.32 ± 2.44

LD<sub>50</sub>为半数致死量

由表 2 可知, 该新型长效土霉素注射液的 LD<sub>50</sub>为 600.32 mg/kg, LD<sub>50</sub>的 95% 的可信区间为 (600.32 ± 2.44) mg/kg。

2.2 局部刺激试验 眼观给药后 2、7、15 d, 颈部注射部位无肿胀, 触摸无硬结。由表 3 可知, 剖杀后取股四头肌, 对注射部位肌肉组织的刺激性反应分级。注射灭菌生理盐水的家兔肌肉组织与正常肌肉组织相同; 注射长效土霉素 2 d 后, 注射部位出现充血、红肿等刺激性反应症状; 随着时间延长和给药剂量增加, 刺激性增强, 注射长效土霉素 7 d 后家兔股四头肌出现红肿、发紫、坏死、光泽消失现象, 15 d 后肌肉组织的坏死范围扩大。

表 3 长效土霉素注射液家兔股四头肌刺激试验结果

Tab 3 Experimental results of tetriceps femoris stimulation with long-acting oxytetracycline injection in rabbits

组别	动物数/只	给药剂量	观察时间/d	反应级
			2	-
1	9	生理盐水 1 mL	7	-
			15	-
			2	+ +
2	9	长效土霉素注射液 0.5 mL	7	+ + +
			15	+ + + +
			2	+ +
3	9	长效土霉素注射液 1 mL	7	+ + + +
			15	+ + + + +

“+”为有刺激性, 数量越多刺激性越大;“-”为无刺激性。

### 3 讨论与结论

由于长效土霉素注射液的临床用法是肌肉注射给药, 而安全性评价的指标又是以剂型为依据进行选择。因此, 选择了急性毒性试验和局部刺激性试验作为安全性评价指标。根据参考土霉素过量使用对肝脏、肾脏所造成的毒副作用的资料<sup>[6]</sup>, 小白鼠会出现食欲减退、精神沉郁和运动失调; 肝脏肿大, 呈黄褐色, 有出血点, 易碎有油腻感; 肾脏肿大, 有出血点, 易碎; 部分小白鼠心脏稍有肿大, 产生心包积液等症状。刘伟<sup>[7]</sup>等试验研究表明, 给小鼠以 465.2 mg/kg 剂量注射长效土霉素注射液时, 小鼠出现精神沉郁、被毛粗糙、嗜睡等症状, 对小鼠进行剖检, 发现小鼠肝脏肿大, 呈黄褐色; 肾脏肿大, 有出血点; 部分小鼠出现心脏稍有肿大, 产生心包积液。在本试验中, 给小白鼠注射新型长效土霉素注射液的剂量为 462.6 mg/kg 时, 同样出现以上相类似的病发症状。且随着给药剂量的增大, 症状越明显。因此, 这表明致小鼠死亡的主要原因为土霉素使用过量。

根据毒理学分级标准, 药物 LD<sub>50</sub>在 500 ~ 5000 mg/kg 为低毒。季进英<sup>[8]</sup>等利用小白鼠检测一种长效土霉素注射液的急性毒性试验中, 测得 LD<sub>50</sub>为

594.58 mg/kg, LD<sub>50</sub> 的 95% 的可信限是 594.58 ± 2.22 mg/kg。根据毒理学分级标准其将长效土霉素注射液定为低毒。而本试验测得新型长效土霉素注射液的 LD<sub>50</sub> 为 600.32 mg/kg, LD<sub>50</sub> 的 95% 的可信区间为 (600.32 ± 2.44) mg/kg。同样在低毒范围内, 该结果与资料试验所得结果一致。且该新型长效土霉素注射液的 LD<sub>50</sub> 偏高, 说明相同致死率, 该新型长效土霉素注射液需用更高的剂量, 由此证明该新型长效土霉素注射液的处方工艺更优异, 药品的急性毒性更小。

季进英<sup>[8]</sup>等利用家兔检测长效土霉素注射液的局部刺激性试验中, 给药 2、7、15 d 后, 眼观无肿胀, 手摸注射部位无硬结, 解剖发现 2 d 后肌肉组织出现充血、红肿现象; 7 d 后肌肉组织出现发紫、坏死; 15 d 后肌肉组织坏死范围扩大。根据家兔股四头肌刺激反应评价标准内容, 由此判断长效土霉素注射液对家兔具有局部刺激性。在本次试验的给药剂量条件下, 表明该药对肌肉组织有一定程度的刺激性, 这与目前有关长效土霉素注射液具有局部刺激作用的报道一致<sup>[9-10]</sup>。

该新型长效土霉素注射液对小白鼠表现为低毒性, 对家兔肌肉组织有一定程度的刺激性。

## 参考文献:

- [1] 李晶, 常明, 常永芳, 等. 长效土霉素注射液的工艺研究[J]. 石家庄学院学报, 2007, 9(6):33-36.  
Li J, Chang M, Chang Y F, *et al.* Study on the technology of long acting oxytetracycline injection[J]. Journal of Shijiazhuang University, 2007, 9(6):33-36.
- [2] 陈杖榴, 邱银生, 曾振灵, 等. 中国动物保健品及畜牧发展趋势峰会[C]. 2001:43-49.  
Chen Z L, Qiu Y S, Zeng Z L, *et al.* China animal health products and animal husbandry development trend Summit [C]. 2001:43-49.
- [3] 春雨, 于家良, 李继红, 等. 三种有机溶媒制备土霉素注射液的稳定性试验[J]. 吉林畜牧兽医, 2006, 27(8):11-12.  
Li C Y, Yu J L, Li J H, *et al.* Stability test of oxytetracycline injection prepared by three organic solvents[J]. Jilin animal husbandry and veterinary, 2006, 27(8):11-12.
- [4] 王玉祥. 药理学实验[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004.  
Wang Y X. Pharmacology experiment[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2004.
- [5] 钱之玉. 药理学实验与指导[M]. 北京: 中国医药科技出版社 1996.  
Qian Z Y. Pharmacology experiment and guidance[M]. Beijing: China Medical Science Press, 1996.
- [6] 孙广龙, 胡立宏. 四环素类抗生素的研究进展[J]. 药学研究, 2017, (1):6-10.  
Sun G L, Hu L H. Research progress of tetracycline antibiotics [J]. Pharmaceutical research, 2017, (1):6-10.
- [7] 刘伟, 欧阳五庆, 赵蓓, 等. 长效土霉素注射液的配方筛选及其质量浓度测定[J]. 西北农业学报, 2011, 20(8):35-38.  
Liu W, Ouyang W Q, Zhao B, *et al.* Formula selection and mass concentration determination of long acting oxytetracycline injection [J]. Journal of Northwest Agriculture, 2011, 20(8):35-38.
- [8] 季进英, 谢淑玲, 李春雨, 等. 一种长效土霉素注射液的安全性试验[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2008, 10(1):6.  
Ji J Y, Xie S L, Li C Y, *et al.* Safety test of a long acting oxytetracycline injection[J]. Journal of Liaoning Agricultural Polytechnic, 2008, 10(1):6.
- [9] Nouws J F, Smulders A, Rappalini M. A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep[J]. J Vet Q, 1990, 12(3):129-138.
- [10] Xia W, J Gyrd-Hansen N, Nielsen P. Comparison of Pharmacokinetic parameters for two oxytetracycline preparations in pigs[J]. J Vet Pharmacol Ther, 1983, 6(2):113-119.

(编辑:侯向辉)